

# 大负荷运动诱导大鼠骨骼肌细胞凋亡的作用及线粒体凋亡机制\*

赵晓琴<sup>1</sup>, 游佳琪<sup>1</sup>, 刘晓然<sup>2</sup>, 孙君志<sup>3</sup>, 李俊平<sup>4</sup>, 王瑞元<sup>4Δ</sup>

(1. 太原理工大学体育学院, 山西 太原 030024; 2. 首都体育学院运动科学与健康学院, 北京 100191; 3. 成都体育学院运动医学与健康研究所, 四川 成都 610041; 4. 北京体育大学运动人体科学学院, 北京 100084)

**【摘要】 目的:** 以丝氨酸蛋白酶 Omi 为切入点, 探究大负荷运动诱导大鼠骨骼肌细胞凋亡的可能机制。**方法:** 126 只健康雄性 SD 大鼠随机分为安静对照组(C), 离心运动组(E), 单纯阻断组(U), 二甲基亚砷(DMSO)组(D), 运动阻断组(EU)。除 C 组外, 其余 4 组随机分为干预后 0 h 组、12 h 组、24 h 组、48 h 组、72 h 组, 每组 6 只。E 组与 EU 组大鼠在跑台上进行坡度为-16°, 速度为 16 m/min, 90 min 的一次性大负荷运动。U 组、D 组与 EU 组进行一次性药物干预, 给予 U 组和 EU 组大鼠腹腔注射 1.5 μmol/kg Omi 特异性抑制剂 Ucf-101, 同样给予 D 组大鼠腹腔注射 1.5 μmol/kg 的 0.5% DMSO, 于实验后不同时间点分批取比目鱼肌, 检测其 Caspase-3, -8, -9, -12 的活性以及 Omi 和 X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白(XIAP)的表达。**结果:** 与 C 组相比, E 组骨骼肌线粒体形态结构发生典型的病理改变, 骨骼肌线粒体膜通透性转换孔(MPTP)开放程度明显增加( $P < 0.01$ )或( $P < 0.05$ ), 同时骨骼肌 Omi、XIAP 蛋白表达均明显增加( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ), Caspase-9, -3 活性也均明显增加( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。与 C 组相比, U 组和 D 组 XIAP 蛋白以及 Caspase-9, -3 活性均无显著差异。EU 组 XIAP 蛋白以及 Caspase-9, -3 活性变化趋势均与 E 组基本一致, 但 XIAP 蛋白变化幅度明显高于 E 组( $P < 0.01$ ), Caspase-9, -3 活性变化幅度明显低于 E 组( $P < 0.01$ )。**结论:** 大负荷运动可以诱导大鼠骨骼肌线粒体形态结构改变, 使 MPTP 高通透性开放, Omi 蛋白表达上调, 进而通过其下游的 XIAP-Caspase 途径, 启动依赖 Caspase-9 介导线粒体凋亡途径, 最终导致肌细胞发生凋亡, 而抑制 Omi 可降低运动诱导骨骼肌细胞的凋亡水平。

**【关键词】** 运动; 骨骼肌; 细胞凋亡; Omi; X 染色体连锁的凋亡抑制蛋白; Ucf-101; 大鼠

**【中图分类号】** G804.2

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1000-6834(2024)01-185-008

**【DOI】** 10.12047/j.cjap.6319.2022.106

## Effects of heavy-load exercise on skeletal muscle cells apoptosis and mechanisms of mitochondrial apoptosis in rats

ZHAO Xiao-qin<sup>1</sup>, YOU Jia-qi<sup>1</sup>, LIU Xiao-ran<sup>2</sup>, SUN Jun-zhi<sup>3</sup>, LI Jun-ping<sup>4</sup>, WANG Rui-yuan<sup>4Δ</sup>

(1. Physical Education College, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024; 2. School of Kinesiology and Health, Capital University of Physical Education and Sports, Beijing 100191; 3. Faculty of Sports Medicine, Chengdu Sport University, Chengdu 610041; 4. Sport Science School, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

**【ABSTRACT】 Objective:** To analyze the molecular mechanisms of skeletal muscle cells apoptosis induced by heavy-load exercise with Omi as the entry point. **Methods:** One hundred and twenty-six adult SD rats were randomly divided into five groups: control group (C), eccentric exercise group (E), simple blocking group (U), DMSO group (D) and exercise block group (EU). In addition to the C group, the other four groups were randomly divided into 0 h after experiment, 12 h after experiment, 24 h after experiment, 48 h after experiment and 72 h after experiment with 6 rats in each group. E and EU group were submitted to a heavy-load exercise on a treadmill down a 16° decline, 16 m/min for 90 minutes. U, D and EU group were one-time intervened with drugs. U and EU groups were intraperitoneally injected with 1.5 μmol/kg ucf-101, D group were intraperitoneally injected with 1.5 μmol/kg 0.5% DMSO. The rats were sacrificed in batches at different time points after experiment, then the soleus were saved to detect the Caspase-3, -8, -9, -12 activities and protein expressions of Omi and XIAP. **Results:** Compared with group C, the mitochondrial distribution and morphology appeared the typical ultrastructure pathological changes, the opening degree of MPTP was increased significantly ( $P < 0.01$ ) or ( $P < 0.05$ ), protein expressions of Omi and XIAP were increased significantly ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), the activities of Caspase-9 and Caspase-3 were increased significantly ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) in group E. Compared with group C, there was no significant difference in XIAP protein and caspase-9, -3 activities in group U and Group D. The change trend of XIAP protein and Caspase-9, -3 activities was the same as those between EU group and E group, but the change range of XIAP protein in EU group was significantly higher than that in E group ( $P < 0.01$ ), and the change ranges of caspase-9, -3 activities in EU group were significantly lower than those in E group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** A single heavy-load exercise can induce changes in the mitochondria morphology and structure in rats, open the high permeability of MPTP, and improve the expression of Omi protein, then through its downstream XIAP-Caspase pathway, start the mitochondrial apoptosis pathway mediated by caspase-9, and finally lead to myocyte apoptosis. The inhibition of Omi can re-

duce the cell apoptosis level of motor induced skeletal muscle cells.

**【KEY WORDS】** exercise; skeletal muscle; cell apoptosis; Omi; XIAP; Ucf-101; rat

人体各种形式的运动,主要是靠骨骼肌的收缩和舒张活动来完成。人体长时间做大负荷运动或维持某个身体姿势,会导致肌肉力量下降、肌肉僵硬或疼痛,若长期持续下去,就会造成工作肌的结构和功能发生损伤性改变,称为运动性骨骼肌损伤。已研究证实细胞凋亡在运动中和运动后诱发的骨骼肌损伤中发挥着重要作用,骨骼肌细胞凋亡可能是训练不当造成肌肉酸痛和运动能力下降的最重要的病理生理机制<sup>[1]</sup>。

丝氨酸蛋白酶 Omi 是作用较强的线粒体促凋亡蛋白,广泛表达于各组织器官,同时参与细胞凋亡的调节<sup>[2]</sup>。在正常情况下,Omi 同细胞色素 C、Smac 共同位于线粒体内外膜之间,应激情况下线粒体膜通透性发生改变,线粒体膜通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放,使这些促凋亡蛋白释放入胞质,进而发挥其促凋亡的生物效应。有研究发现<sup>[3]</sup>,Omi 能通过与 X 染色体连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)相互作用,进而激活下游的 Caspase 诱导细胞凋亡。我们前期研究发现<sup>[4]</sup>,依赖 Caspase-9 的线粒体凋亡途径在离心运动诱导的细胞凋亡中发挥重要作用。但 Omi 作为较强的线粒体促凋亡蛋白,是否以及如何参与骨骼肌线粒体凋亡途径,还有待进一步证实。

因此,本研究通过建立大鼠大负荷离心收缩造成的骨骼肌损伤模型,旨在观察运动后骨骼肌线粒体形态结构及功能的变化,以 Omi 为切入点,结合其抑制剂 Ucf-101 干预,探究大负荷运动诱导骨骼肌线粒体凋亡的可能机制,为调节运动致骨骼肌细胞凋亡、预防运动损伤提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物分组与干预方案

8 周龄健康雄性 SD 大鼠 126 只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证编号是 SCXK(京)2009-0007。将大鼠随机分成 5 大组:安静对照组(C 组,  $n=6$ ),离心运动组(E 组,  $n=30$ ),单纯阻

断组(U 组,  $n=30$ ),DMSO 组(D 组,  $n=30$ ),运动阻断组(EU 组,  $n=30$ )。所有大鼠都在中国医学科学院药用植物研究所动物房内喂养。其中,除安静对照组外,其余组按实验后时间点又分为 0 h 组( $n=6$ )、12 h 组( $n=6$ )、24 h 组( $n=6$ )、48 h 组( $n=6$ )和 72 h 组( $n=6$ )。

(1)运动方案:在正式运动前,离心运动组和运动阻断组大鼠要进行适应性跑台运动(坡度:0°,速度:16 m/min,3 d)。第 1 日运动 5 min;第 2 日运动 10 min;第 3 日不运动;第 4 日正式运动(坡度:-16°,速度:16 m/min,时间:90 min)<sup>[5]</sup>。

(2)药物干预方案:给予单纯阻断组和运动阻断组大鼠在正式运动前 10 min 腹腔注射 1.5  $\mu\text{mol/kg}$  Omi 特异性抑制剂 Ucf-101<sup>[6]</sup>,同样给予 DMSO 组大鼠腹腔注射 1.5  $\mu\text{mol/kg}$  的 0.5% DMSO。

### 1.2 主要试剂

Omi 的抑制剂 Ucf-101 购自 Merck 公司;AFC, Ac-DEVD-AFC, Ac-LEHD-AFC, 标准品均购自 BIOMOL 公司;Bradford 蛋白定量试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Western 及 IP 裂解液和 PMSF 购自碧云天生物技术研究所;磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司;抗 Omi 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;抗 XIAP 抗体购自美国 Cell Signaling 公司;Anti-GAPDH antibody 购自美国 Sigma 公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG 和 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 标本收集

于实验结束后各时间点分批麻醉大鼠,分离右后肢比目鱼肌取材。将分离好的比目鱼肌分为两部分,一部分切成 1.5 mm  $\times$  1 mm 左右的小块,将其投入 2.5% 戊二醛中固定 24 h 以上,之后置于 4°C 保存,以备透射电子显微镜观察;另一部分置于冻存管,液氮速冻后移至-80°C 冰箱冷冻保存,用于检测其 MPTP 的开放程度、Caspase-3, -8, -9, -12 的活性以及 Omi 和 XIAP 表达。

### 1.4 骨骼肌线粒体超微结构的观察

从 2.5% 戊二醛固定液中取出比目鱼肌小块,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗,再用 1% 锇酸将其固定 2 h,再次用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗。随后依次在 30%、50%、70%、80%、90% 和 100% 的丙酮溶液中脱水,再采用环氧树脂 Spurr 包埋后,用 LEI-

\*【基金项目】国家自然科学基金项目(31471133),山西省自然科学基金面上项目(201901D111079)和 2022 年太原理工大学学科建设经费

【收稿日期】2022-05-27【修回日期】2022-09-28

△【通讯作者】Tel: 13501056993; E-mail: wangry@vip.sina.com

CAUC6I 型切片机将其纵切为 50 ~ 70 nm 的超薄切片, 最后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅进行双染色 15 ~ 30 min。JEM-1230 透射电子显微镜观察线粒体的分布及其超微结构。

### 1.5 骨骼肌 MPTP 开放的测定

采用  $\text{CaCl}_2$  诱发线粒体肿胀试验检测 MPTP 的开放程度<sup>[7]</sup>。常规提取比目鱼肌线粒体悬浮液, 取浓度为 0.3 mg/ml 的比目鱼肌线粒体溶液 100  $\mu\text{l}$ , 加入 2 ml 含有 120 mmol/L KCl、5 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、20 mmol/L MOPS、10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4 的反应缓冲液, 孵育 2 min, 再加入 200  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CaCl}_2$  诱发线粒体肿胀, 最后使用 G1115A 型紫外分光光度计检测 540 nm 处线粒体的吸光度(A), 设加入  $\text{CaCl}_2$  即刻的吸光度值为  $A_0$ , 加入  $\text{CaCl}_2$  反应 10 min 后的吸光度值为  $A_1$ , 二者的差值 ( $\Delta A_{540} = A_0 - A_1$ ) 可表示 MPTP 的活性, 差值越大, 表示 MPTP 开放程度越大。

### 1.6 骨骼肌 Omi 和 XIAP 蛋白表达的测定

常规提取比目鱼肌组织, 测定其蛋白浓度后, 将样品浓度调至 3  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , 每孔上样 20  $\mu\text{l}$ 。聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白(浓缩胶 90 V 电压, 分离胶 140 V 电压), 湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上(恒流 300 mA, 90 min)。室温或 4 $^{\circ}\text{C}$  于 5% BSA 封闭液中封闭 3 h。一抗(Omi: 1:100; XIAP: 1:1000; GAPDH: 1:1000)孵育过夜。第 2 日室温 TBST 洗膜 6 次, 每次 5 min。加入用封闭液稀释的二抗(羊抗兔 IgG 和羊抗小鼠 IgG 均按 1:5000 稀释)孵育 50 min。再次 TBST 洗膜 6 次, 每次 5 min。将膜滴上超敏发光液, 于凝胶成像系统曝光显像。

### 1.7 骨骼肌 Omi 和 XIAP 相互作用的测定

采用免疫共沉淀法检测 Omi 与 XIAP 的相互作用。常规离心提取大鼠比目鱼肌, 并测定样品蛋白浓度, 将样品浓度调至 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。将样品按 500:1 加入小鼠 IgG, 25:1 加入琼脂糖 A/G 摇转 30 min 以清除非特异性结合。接着离心取上清, 按 250:1 的比例加入 Omi 抗体, 于 4 $^{\circ}\text{C}$  摇转过夜。次日再离心弃上清, 裂解液洗涤 beads, 再离心弃上清 3 次。再加入 15  $\mu\text{l}$  2 $\times$ 上样缓冲液, 95 $^{\circ}\text{C}$  孵育。最后再离心取样品上清进行 Western blot 检测, 方法同上。

### 1.8 骨骼肌 Caspase 活性的测定

死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径是细胞凋亡的主要途径, 均能引起 Caspase-3 的活化, 导致细胞凋亡。故细胞凋亡的程度可以用 Caspase-3 活化来反映, 而线粒体凋亡途径则可用 Caspase-9 活化来反映。取骨骼肌组织 100 mg, 加入裂解液 1

ml, 剪碎、匀浆、离心后取上清液。于避光酶标板上标准孔中加入不同浓度 AFC 标准品溶液 100  $\mu\text{l}$  作为标准曲线; 在各样品孔中分别加入组织上清液 30  $\mu\text{l}$ , 2 $\times$ Reaction buffer 50  $\mu\text{l}$ , Caspase-9 荧光底物 (Ac-LEHD-AFC) 或 Caspase-3 荧光底物 (Ac-DEVD-AFC) 10  $\mu\text{l}$ , 蒸馏水 10  $\mu\text{l}$ , 振荡混匀; 在参数为 405 nm, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 1.5 h 的荧光酶标仪中每隔 15 min 连续检测其光密度值。

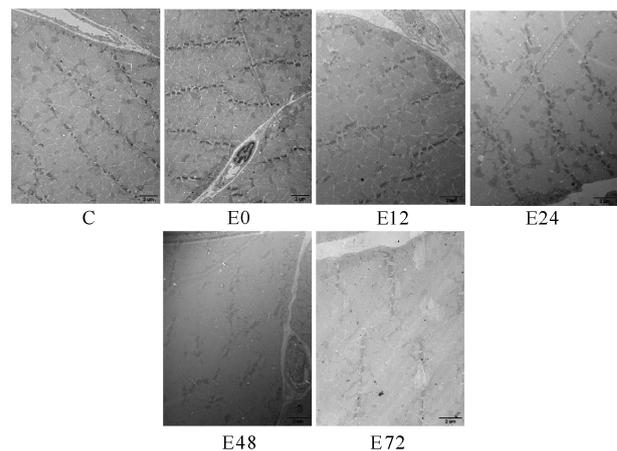
### 1.9 统计学处理

所有实验结果以平均值 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 18.0 软件分析数据, 统计方法采用双因素方差 (two-way ANOVA) 分析, 对处理因素 (安静对照、离心运动、抑制剂、DMSO 和运动抑制剂) 和时间因素 (干预后 0 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h) 的主效应及其交互作用分析。如处理因素和时间因素交互作用不显著 ( $P>0.05$ ), 则建立非饱和模型分析; 如处理因素和时间因素交互作用显著 ( $P<0.05$ ), 则对不同组别采用 SNK- $q$  检验进一步比较, 并参考 Bonferroni 法和 Tukey 法的比较结果。

## 2 结果

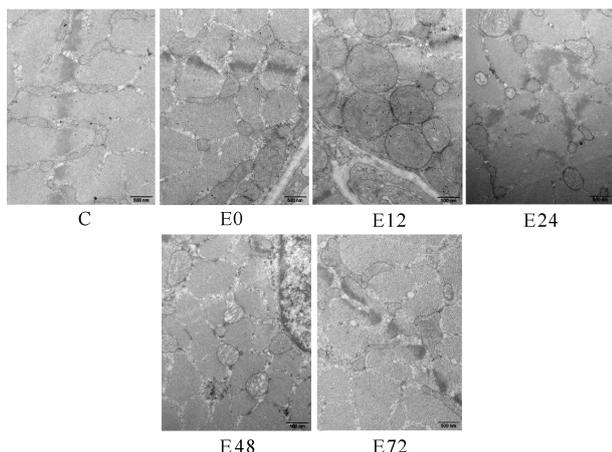
### 2.1 骨骼肌线粒体超微结构变化

如图 1, 图 2 所示, 安静对照组大鼠骨骼肌 Z 线呈线性排列, 线粒体均匀分布其两侧。线粒体多为长线形, 膜结构清晰完整, 嵴结构密集, 基质深。一次离心运动后 0 h Z 线排列紊乱, 线粒体开始于肌膜下积聚, 线粒体变大, 嵴结构发散。离心运动后



**Fig. 1** Electron microscopic observation of skeletal muscle mitochondrial ultrastructure after eccentric exercise ( $\times 10\ 000$ )  
C: Control group; E0: 0 hours after eccentric exercise group; E12: 12 hours after eccentric exercise group; E24: 24 hours after eccentric exercise group; E48: 48 hours after eccentric exercise group; E72: 72 hours after eccentric exercise group

12 h 骨骼肌 Z 线模糊不清,线粒体大量积聚于肌膜下,线粒体变圆,甚至呈空泡,膜结构不完整甚至消失,嵴结构稀少,基质变浅,此时线粒体损伤最为严重。离心运动后 24 h 骨骼肌 Z 线较为清晰,线粒体分布较均匀,于肌膜下减少,线粒体形态有所恢复,膜结构较清晰,嵴变多而密,基质变深。离心运动后 48 h 线粒体再次呈损伤表现,但损伤程度已较 12 h 大大减轻。离心运动后 72 h 线粒体分布及其形态结构已基本恢复至正常水平。



**Fig. 2** Electron microscopic observation of skeletal muscle mitochondrial ultrastructure after eccentric exercise ( $\times 40\ 000$ )

C: Control group; E0: 0 hours after eccentric exercise group; E12: 12 hours after eccentric exercise group; E24: 24 hours after eccentric exercise group; E48: 48 hours after eccentric exercise group; E72: 72 hours after eccentric exercise group

### 2.2 骨骼肌 MPTP 开放变化

如表 1 所示,与 C 组相比,大鼠骨骼肌组织 MPTP 开放程度在离心运动后 0 h 至 48 h 显著升高,72 h 已恢复到正常水平,且在 12 h 升至最高峰。提示,离心运动可以导致 MPTP 开放程度增大。

**Tab. 1** Changes of skeletal muscle MPTP opening and Omi/XIAP complex after eccentric exercise ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

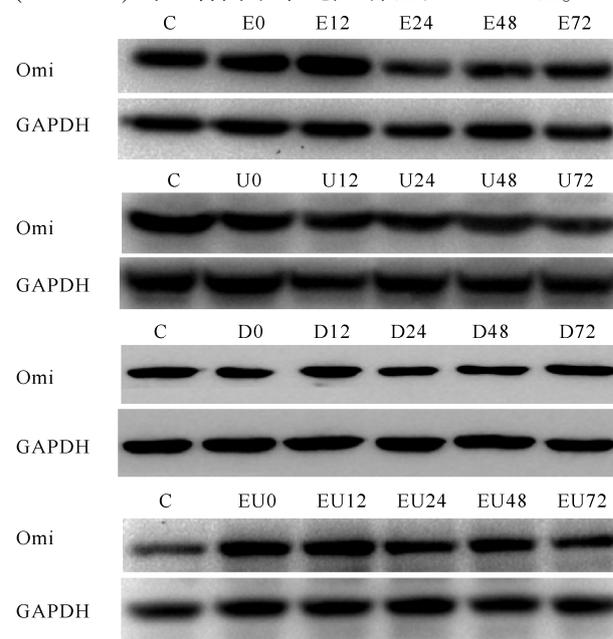
Group	MPTP activity ( $\Delta A_{540}$ )	Omi/XIAP complex
C	0.065 $\pm$ 0.027	1.000 $\pm$ 0.289
E0	0.122 $\pm$ 0.031 *	3.523 $\pm$ 0.373 **
E12	0.183 $\pm$ 0.022 **	7.924 $\pm$ 0.354 **
E24	0.166 $\pm$ 0.026 **	10.221 $\pm$ 0.469 **
E48	0.131 $\pm$ 0.019 *	9.070 $\pm$ 0.492 **
E72	0.084 $\pm$ 0.021	8.363 $\pm$ 0.303 **

MPTP: Mitochondrial permeability transition pore; C: Control group; E0: 0 hours after eccentric exercise group; E12: 12 hours after eccentric exercise group; E24: 24 hours after eccentric exercise group; E48: 48 hours after eccentric exercise group; E72: 72 hours after eccentric exercise group

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs C

### 2.3 骨骼肌 Omi 蛋白表达变化

如图 3,表 2 所示,(1)离心运动组:骨骼肌 Omi 蛋白表达在离心运动后 0 h 显著升高( $P < 0.01$ ),12 h 上升到最高峰( $P < 0.01$ ),之后至 48 h 呈逐渐下降趋势( $P < 0.01$ ),至运动后 72 h 恢复到安静对照组水平。(2)单纯阻断组:与安静对照组相比,单纯阻断组 Omi 蛋白表达在干预后 12 h ( $P < 0.05$ )至 72 h ( $P < 0.05$ )均显著降低;与离心运动组相比,Omi 蛋白表达在各时间点( $P < 0.01$ )均显著低于离心运动组。(3)DMSO 组:与安静对照组相比,DMSO 组不同时程 Omi 蛋白表达无显著差异;与离心运动组相比,除干预后 72 h 外,DMSO 组 Omi 蛋白表达各时间点( $P < 0.01$ )均显著低于离心运动组;与单纯阻断组相比,DMSO 组 Omi 蛋白表达在干预后 12 h ( $P < 0.01$ ),48 h ( $P < 0.01$ )明显升高。(4)运动阻断组:Omi 蛋白表达与安静对照组相比在运动阻断后 0 h 开始显著升高( $P < 0.01$ ),12 h ( $P < 0.01$ )上升到最高峰,24 h ( $P < 0.01$ )虽有所下降但仍显著高于安静对照组,48 h 至 72 h 逐渐下降基本恢复至安静对照组水平;与离心运动组相比,Omi 蛋白表达在运动阻断后 0 h ( $P < 0.01$ )和 12 h ( $P < 0.01$ )明显升高,其余时间点均无显著差异;与单纯阻断组和 DMSO 组相比,除 72 h 外,运动阻断组 Omi 蛋白表达各时间点( $P < 0.01$ )均显著高于单纯阻断组和 DMSO 组。



**Fig. 3** Changes of Omi protein expressions in skeletal muscle after eccentric exercise and UCF-101 intervention

C: Control group; E: Eccentric exercise group; U: Simple blocking group; D: DMSO group; EU: Exercise block group

**Tab. 2** Changes of Omi protein expressions in skeletal muscle after eccentric exercise and UCF-101 intervention( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ) Omi (% C group)

Group	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
E	2.395±0.193 <sup>**△△▲▲</sup>	3.123±0.232 <sup>**△△▲▲○○</sup>	1.947±0.174 <sup>**△△▲▲○○●●</sup>	1.737±0.129 <sup>**△△▲▲○○●●</sup>	1.223±0.183 <sup>△△○○●●□□■</sup>
U	0.777±0.202 <sup>##</sup>	0.639±0.097 <sup>*###▲▲</sup>	0.609±0.132 <sup>##</sup>	0.542±0.128 <sup>*###▲▲</sup>	0.594±0.193 <sup>*###</sup>
D	0.943±0.149 <sup>##</sup>	1.138±0.127 <sup>##△△</sup>	0.973±0.183 <sup>##</sup>	1.173±0.192 <sup>##△△</sup>	0.841±0.103
EU	1.596±0.210 <sup>***###△△▲▲</sup>	2.642±0.172 <sup>***###△△▲▲○○</sup>	2.120±0.193 <sup>**###△△▲▲○○●●</sup>	1.303±0.168 <sup>##△△●●■</sup>	0.835±0.171 <sup>○○●●□□■</sup>

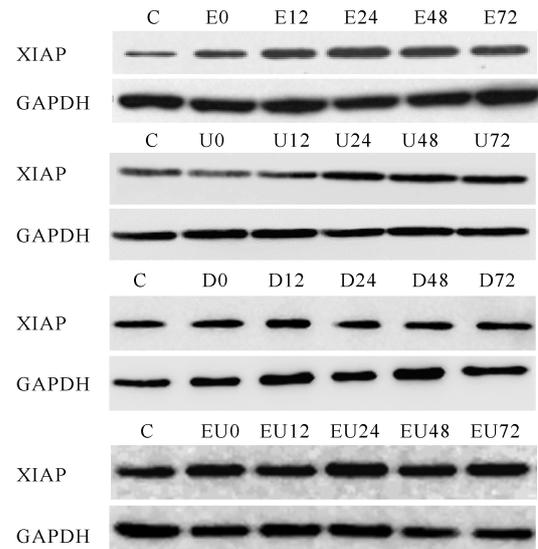
C: Control group; E: Eccentric exercise group; U: Simple blocking group; D: DMSO group; EU: Exercise block group

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs C in the group; # $P<0.05$ , ## $P<0.01$  vs E at the same time; △△ $P<0.01$  vs U at the same time; ▲▲ $P<0.01$  vs D at the same time; ○○ $P<0.01$  vs 0 h in the group; ●● $P<0.05$ , ●● $P<0.01$  vs 12 h in the group; □□ $P<0.01$  vs 24 h in the group; ■ $P<0.05$ , ■■ $P<0.01$  vs 48 h in the group

**2.4 骨骼肌 XIAP 蛋白表达变化**

如图 4,表 3 所示,(1)离心运动组:骨骼肌 XIAP 蛋白表达在运动后 0 h 明显升高( $P<0.01$ ),48 h 上升至最高( $P<0.01$ ),72 h 有所下降但仍显著高于安静对照组( $P<0.01$ )。(2)单纯阻断组和 DMSO 组:与安静对照组相比,这两组 XIAP 蛋白表达均无显著差异;与离心运动组相比,单纯阻断组 XIAP 蛋白表达在干预后 12 h 至 72 h 均显著低于离心运动组相应时间点( $P<0.01$ ),DMSO 组 XIAP 蛋白表达全程均显著低于离心运动组相应时间点( $P<0.01$ )。(3)运动阻断组:与安静对照组相比,运动阻断组 XIAP 蛋白表达在实验后 0 h 明显升高( $P<0.05$ ),24 h 达最高峰( $P<0.01$ ),48 h 和 72 h 有所下降但仍显著高于安静对照组( $P<0.01$ );与离心运动组相比,XIAP 蛋白表达运动阻断组除 12 h 和 24 h 显著高于运动组( $P<0.01$ ),其余时间点均无显著差异;与单纯阻断组相比,运动阻断后 12 h 至 72 h XIAP 蛋白表达均显著升高( $P<0.01$ );与 DMSO 组相比,运动阻断后各时间点 XIAP 蛋白表达均显著升高( $P$

$<0.01$ )。



**Fig. 4** Changes of XIAP protein expressions in skeletal muscle after eccentric exercise and UCF-101 intervention

C: Control group; E: Eccentric exercise group; U: Simple blocking group; D: DMSO group; EU: Exercise block group

**Tab. 3** Changes of XIAP protein expressions in skeletal muscle after eccentric exercise and UCF-101 intervention( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ) XIAP (% C group)

Group	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
E	1.547±0.234 <sup>**▲▲</sup>	2.973±0.194 <sup>**△△▲▲○○</sup>	3.517±0.269 <sup>**△△▲▲○○●●</sup>	3.951±0.193 <sup>**△△▲▲○○●●□□</sup>	2.010±0.202 <sup>**△△▲▲○○●●□□■</sup>
U	1.213±0.152	1.129±0.174 <sup>##</sup>	1.243±0.119 <sup>##</sup>	0.926±0.092 <sup>##</sup>	0.837±0.127 <sup>##</sup>
D	0.903±0.183 <sup>##</sup>	0.872±0.192 <sup>##</sup>	1.139±0.126 <sup>##</sup>	1.204±0.112 <sup>##</sup>	0.914±0.187 <sup>##</sup>
EU	1.472±0.213 <sup>*▲▲</sup>	3.493±0.201 <sup>***###△△▲▲○○</sup>	5.139±0.182 <sup>**###△△▲▲○○●●</sup>	3.736±0.192 <sup>**△△▲▲○○□□</sup>	1.662±0.146 <sup>**△△▲▲●●□□■</sup>

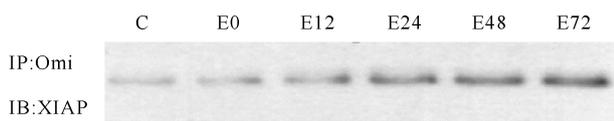
C: Control group; E: Eccentric exercise group; U: Simple blocking group; D: DMSO group; EU: Exercise block group

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs C in the group; ## $P<0.01$  vs E at the same time; △△ $P<0.01$  vs U at the same time; ▲▲ $P<0.01$  vs D at the same time; ○○ $P<0.01$  vs 0 h in the group; ●● $P<0.01$  vs 12 h in the group; □□ $P<0.01$  vs 24 h in the group; ■■ $P<0.01$  vs 48 h in the group

**2.5 骨骼肌 Omi 和 XIAP 相互作用变化**

用免疫共沉淀法检测大鼠骨骼肌组织 Omi 和 XIAP 的相互作用。如表 1,图 5 所示,与安静对照组相比,离心运动后 0 h 至 72 h 大鼠骨骼肌 Omi 和

XIAP 结合量均显著升高,于运动后 24 h 升至最高峰。提示,离心运动后骨骼肌 Omi 和 XIAP 存在相互结合作用。



**Fig. 5** Changes of skeletal muscle Omi/XIAP complex after eccentric exercise

C: Control group; E0: 0 hours after eccentric exercise group; E12: 12 hours after eccentric exercise group; E24: 24 hours after eccentric exercise group; E48: 48 hours after eccentric exercise group; E72: 72 hours after eccentric exercise group

### 2.6 骨骼肌 Caspase-9 活性变化

如表 4 所示, (1) 离心运动组: 不同时间程 Caspase-9 活性在运动后 0 h 稍有升高, 在 12 h 升至最高 ( $P < 0.01$ ), 之后逐渐下降, 但至 48 h ( $P < 0.01$ ) 仍都高于安静对照组水平, 至 72 h 仍高于安静对照组, 但无显著差异。(2) 单纯阻断组与 DMSO 组: 与安静对照组相比, 单纯阻断组与 DMSO 组全程骨骼

肌 Caspase-9 活性均无统计学差异; 与离心运动组相比, Caspase-9 活性在单纯阻断后 12 h 至 48 h 均显著低于离心运动组 ( $P < 0.01$ ); DMSO 组 Caspase-9 活性在干预后 0 h 至 48 h 全程均低于离心运动组 ( $P < 0.01$ )。与单纯阻断组相比, DMSO 组 Caspase-9 活性全程均无显著差异。(3) 运动阻断组: 与安静对照组相比, Caspase-9 活性在运动阻断后 0 h 有所升高, 12 h 升至最高 ( $P < 0.01$ ), 24 h 有所下降但仍较高 ( $P < 0.05$ ), 在 48 h 和 72 h 已逐渐恢复到安静水平; 与离心运动组相比, 运动阻断组 Caspase-9 活性变化与离心运动组趋势相同, 且均低于离心运动组, 但只有 12 h 和 48 h 差异显著 ( $P < 0.01$ ); 与单纯阻断组相比, Caspase-9 活性在运动阻断后 12 h ( $P < 0.01$ ) 和 24 h ( $P < 0.05$ ) 显著升高。与 DMSO 组相比, Caspase-9 活性在运动阻断后 0 h ( $P < 0.05$ ) 和 12 h ( $P < 0.01$ ) 显著升高。

**Tab. 4** Changes of skeletal muscle Caspase-9 activity after eccentric exercise and UCF-101 intervention ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ ) Caspase-9 activity (nmol/(h · mg))

Group	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
E	0.081±0.017 <sup>▲</sup>	0.156±0.015 <sup>**△▲▲○○</sup>	0.122±0.012 <sup>**△▲▲▲</sup>	0.116±0.013 <sup>**△▲▲▲●</sup>	0.084±0.013 <sup>●●□</sup>
U	0.049±0.010	0.053±0.014 <sup>##</sup>	0.045±0.008 <sup>##</sup>	0.040±0.009 <sup>##</sup>	0.055±0.012
D	0.043±0.007 <sup>#</sup>	0.051±0.017 <sup>##</sup>	0.062±0.011 <sup>##</sup>	0.046±0.013 <sup>##</sup>	0.058±0.009
EU	0.063±0.013 <sup>▲</sup>	0.108±0.012 <sup>**##△▲▲○○</sup>	0.099±0.007 <sup>*△</sup>	0.061±0.013 <sup>##●●</sup>	0.049±0.017 <sup>●●□□</sup>

C: Control group; E: Eccentric exercise group; U: Simple blocking group; D: DMSO group; EU: Exercise block group

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs C in the group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs E at the same time; △ $P < 0.05$ , △△ $P < 0.01$  vs U at the same time; ▲ $P < 0.05$ , ▲▲ $P < 0.01$  vs D at the same time; ○○ $P < 0.01$  vs 0 h in the group; ● $P < 0.05$ , ●● $P < 0.01$  vs 12 h in the group; □ $P < 0.05$ , □□ $P < 0.01$  vs 24 h in the group

### 2.7 骨骼肌 Caspase-3 活性变化

如表 5 所示, (1) 离心运动组: Caspase-3 活性在运动后 0 h ( $P < 0.05$ ), 12 h ( $P < 0.01$ ), 24 h ( $P < 0.01$ ), 48 h ( $P < 0.05$ ) 显著高于安静对照组, 12 h 升至最高, 离心运动后 72 h 恢复至正常水平。(2) 单纯阻断组: 与安静对照组相比, 单纯阻断组全程 Caspase-3 活性均无显著差异; 与离心运动组相比, Caspase-3 活性在单纯阻断干预后 12 h ( $P < 0.01$ ) 至 48 h ( $P < 0.01$ ) 均显著低于相应时间点。(3) DMSO 组: 与安静对照组相比, DMSO 组全程 Caspase-3 活性均无统计学差异; 与离心运动组相比, DMSO 组 Caspase-3 活性在干预后 0 h ( $P < 0.01$ ) 至 48 h ( $P < 0.01$ ) 均显著低于离心运动组; 与单纯阻断组相比, DMSO 组全程 Caspase-3 活性变化无显著差异。(4) 运动阻断组: 与安静对照组相比, Caspase-3 活性在运动阻断后 0 h 稍有升高, 12 h 达顶峰 ( $P < 0.01$ ), 24 h ( $P < 0.05$ ) 有所下降但仍高于安静对照组, 48 h 和 72 h 逐渐恢复到安静对照水平; 与离心运动组相

比, Caspase-3 活性在运动阻断后 12 h ( $P < 0.01$ ) 显著低于离心运动组; 与单纯阻断组相比, Caspase-3 活性在运动阻断后 12 h ( $P < 0.01$ ) 和 24 h ( $P < 0.01$ ) 显著升高; 与 DMSO 组相比, Caspase-3 活性在运动阻断后 0 h ( $P < 0.05$ ), 12 h ( $P < 0.01$ ) 和 24 h ( $P < 0.05$ ) 显著高于 DMSO 组。

## 3 讨论

### 3.1 一次大负荷运动对骨骼肌线粒体超微结构的影响

一次大负荷运动尤其是大强度的离心运动后, 肌肉损伤最为严重, 表现为肌力下降, 炎症因子增加, 肌膜骨架蛋白降解或丢失, 超微结构发生改变。本研究显示, 给予大鼠一次性大负荷离心运动后, 肌纤维 Z 线排列紊乱, 线粒体开始向肌膜聚集, 线粒体形态结构出现异常。运动后 12 h 线粒体损伤最严重, Z 线失去线性排列甚至消失, 线粒体分布不均匀, 大量积聚于肌膜下, 线粒体变大变圆甚至呈空泡

**Tab. 5** Changes of skeletal muscle Caspase-3 activity after eccentric exercise and UCF-101 intervention( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ ) Caspase-3 activity(nmol/(h·mg))

Group	0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
E	2.498±0.245 *▲▲	3.361±0.206 **△▲▲○○	2.682±0.270 **△▲▲▲	2.395±0.184 *△▲▲▲●●	1.942±0.195 ○○●●□□
U	2.198±0.163	1.729±0.142 <sup>##</sup>	1.695±0.119 <sup>##</sup>	1.840±0.201 <sup>##</sup>	1.676±0.163
D	1.739±0.210 <sup>##</sup>	2.125±0.137 <sup>##</sup>	2.096±0.113 <sup>##</sup>	1.842±0.150 <sup>##</sup>	1.926±0.192
EU	2.231±0.183▲	2.836±0.139 **##△▲▲○○	2.419±0.223 *△▲▲▲●	2.168±0.173●●	2.036±0.163●●□

C: Control group; E: Eccentric exercise group; U: Simple blocking group; D: DMSO group; EU: Exercise block group

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  vs C in the group; <sup>##</sup> $P<0.01$  vs E at the same time; <sup>△</sup> $P<0.05$ , <sup>△△</sup> $P<0.01$  vs U at the same time; <sup>▲</sup> $P<0.05$ , <sup>▲▲</sup> $P<0.01$  vs D at the same time; <sup>○○</sup> $P<0.01$  vs 0 h in the group; <sup>●</sup> $P<0.05$ , <sup>●●</sup> $P<0.01$  vs 12 h in the group; <sup>□</sup> $P<0.05$ , <sup>□□</sup> $P<0.01$  vs 24 h in the group

状,膜结构不完整甚至消失,嵴稀少,基质变浅。运动后 24 h 线粒体形态结构有所恢复。48 h 线粒体损伤再次严重,但程度比 12 h 大大减轻。运动后 72 h 线粒体形态结构已基本恢复正常。提示,大负荷离心运动可以导致骨骼肌线粒体形态结构发生典型的病理改变。已有报道<sup>[8]</sup>,一次力竭离心运动后 0 h 大鼠肱三头肌线粒体多呈空泡状,部分线粒体破裂;而运动后 48 h 和 72 h 线粒体形态结构改变最为严重,线粒体几乎无完整,部分嵴缺损,线粒体由絮状逐渐变为髓样。该报道与本研究结果不大一致,可能是由于所采用的运动负荷和运动时间不同所致,该报道采用 200 min 的力竭性运动,而本研究为 90 min。提示,运动诱发的线粒体超微结构改变可能与运动形式、运动强度及运动时间密切相关。

### 3.2 一次大负荷运动对骨骼肌 MPTP 的影响

线粒体功能的正常发挥依赖于其膜结构的稳定。MPTP 是位于线粒体膜上的蛋白复合体,其开放状态决定了膜的通透性<sup>[9]</sup>。生理状态下 MPTP 多呈关闭状态,只选择性地允许小分子物质通过;病理状态下 MPTP 开放增加,致使线粒体促凋亡蛋白细胞色素 C 等释放入细胞质,启动 Caspase-9 依赖的线粒体凋亡途径,进而激活 Caspase-3,最终导致细胞发生凋亡<sup>[10]</sup>。本研究结果显示,一次大负荷离心运动后骨骼肌 MPTP 开放程度增大,而运动后 12 h MPTP 开放程度最为显著。而前述一次大负荷离心运动后骨骼肌线粒体形态结构异常,同样运动后 12 h 损伤最为严重。我们分析,一次大负荷离心运动能导致骨骼肌形态结构发生病理改变,MPTP 高通透开放,致使线粒体促凋亡蛋白释放入细胞质,进而相继激活 Caspase-9 及 Caspase-3,最终造成肌细胞凋亡。提示,线粒体凋亡途径在运动诱导的骨骼肌细胞凋亡中发挥极为重要的作用。

### 3.3 Omi 对运动损伤细胞凋亡的影响

Omi 是目前发现的作用较强的线粒体促凋亡蛋白,但其本质是丝氨酸蛋白酶<sup>[11]</sup>。内质网合成的

Omi 前体通过线粒体定位序列引导进入线粒体,之后在线粒体内经加工后形成成熟的 Omi。Omi 在正常生理情况下位于线粒体膜间隙,当细胞受到应激刺激时线粒体膜通透性转换孔开放增加,进而 Omi 被释放入胞质并发挥其促凋亡作用。研究发现几种不同的细胞过表达 Omi 可显著引发凋亡的发生<sup>[12]</sup>,而敲除 Omi 后细胞对凋亡能产生更强的抵抗性<sup>[13]</sup>。因此,作为抑制细胞凋亡的分子靶点,研究 Omi 具有重要的意义。本研究发现,一次大负荷离心运动后骨骼肌 Omi 蛋白表达明显增加,同时运动后 12 h 达到最高,之后至 72 h 逐渐恢复正常,提示线粒体促凋亡蛋白 Omi 可能在离心运动后早期的骨骼肌细胞凋亡过程中发挥重要作用。综上所述,大鼠骨骼肌线粒体超微结构损伤、MPTP 开放程度增加以及 Caspase-9,-3 的活性升高均在大负荷运动后 12 h 最为明显,而 Omi 蛋白表达也在运动后 12 h 增至最高,因此,推测细胞凋亡与肌肉损伤可能同时发生,Omi 介导细胞凋亡可能是大负荷运动致骨骼肌损伤的另一重要原因。

XIAP 是 IAPs 家族中最具有特征性、作用最强的内源性 Caspases 抑制蛋白,能直接结合并最有效地抑制 Caspases 的活性<sup>[14]</sup>。XIAP 有 BIR1,BIR2 和 BIR3 三个重复序列。作为 XIAP 抗凋亡的最小结构单位,BIR2 结构域能通过直接结合 Caspase-3 发挥抗凋亡效应,而 BIR3 结构域则能直接结合并抑制 Caspase-9 的活性<sup>[15]</sup>。此外,已证实 XIAP 是促凋亡因子 Omi 的底物。Omi 可与 XIAP 的 BIR2、BIR3 结构域直接结合,致使 XIAP 分别释放和激活 Caspase-3 和 Caspase-9,最终发挥其促凋亡作用<sup>[16]</sup>。已知 Omi 的特异性抑制剂 Ucf-101 能在不影响其他蛋白的情况下抑制 Omi 的表达<sup>[17]</sup>。为探究 Omi 对运动损伤致肌细胞凋亡的影响,本研究给予大鼠 Omi 特异性抑制剂 Ucf-101 进行干预后显示,Ucf-101 能明显增加离心运动后骨骼肌 XIAP 的蛋白表达,同时能明显降低运动后 Caspase-9 和 Caspase-3 活性。同

时发现,Omi 与 XIAP 在离心运动诱导的肌细胞凋亡中存在相互结合作用。以上结果提示,在大负荷离心运动诱导的骨骼肌细胞凋亡中,Omi 可能通过结合并抑制 XIAP,进而终止 XIAP 对 Caspase-9 及 Caspase-3 的活化,启动依赖 Caspase-9 的线粒体凋亡途径,最终导致肌细胞凋亡。

综上所述,一次性大负荷离心运动可以诱导大鼠骨骼肌线粒体形态结构发生改变,使 MPTP 高通透性开放,Omi 蛋白表达上调,进而通过其下游的 XIAP-Caspase 途径,启动线粒体凋亡途径,最终导致肌细胞发生凋亡。而抑制 Omi 可降低运动诱导骨骼肌细胞的凋亡水平。

### 【参考文献】

- [1] 宋卫红,汤长发,刘文锋. 离心运动对大鼠骨骼肌细胞凋亡和增殖的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2013, 29(1): 86-90.
- [2] Du Y, Yang D, Dong X, *et al.* Omi inhibition ameliorates neuron apoptosis and neurological deficit after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Genes Genom*, 2021, 43(12): 1423-1432.
- [3] Su XJ, Huang L, Qu Y, *et al.* Progress in research on the role of Omi/HtrA2 in neurological diseases[J]. *Rev Neurosci*, 2019, 30(3): 279-287.
- [4] 赵晓琴,孙君志,白胜超,等. 针刺对离心运动大鼠骨骼肌 Omi/XIAP 信号通路的影响[J]. 西安体育学院学报, 2018, 35(4): 468-477.
- [5] 张欣,王瑞元. 大负荷运动诱导大鼠骨骼肌损伤对其自噬超微结构及 Beclin1 和 LC-3 II/I 的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2020, 36(4): 296-300.
- [6] Wang P, Hu Y, Yao D, *et al.* Omi/HtrA2 regulates a mitochondria-dependent apoptotic pathway in a murine model of septic encephalopathy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(6): 2163-2173.
- [7] 连婷,张瑞君,熊晓兰,等. 线粒体通透性转换孔在锌缺乏模型大鼠心肌缺血/再灌注损伤中的作用[J]. 基础医学与临床, 2022, 42(3): 389-394.
- [8] 张海平,宋吉锐. 一次力竭性离心运动对大鼠肱三头肌超微结构的影响[J]. 上海体育学院学报, 2008, 32(5): 44-47.
- [9] Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(6): 821-831.
- [10] 王振涛,任雪萍,吴鸿,等. 抗纤益心方干预线粒体通透性转换孔抑制心肌细胞凋亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 42-48.
- [11] Chung HJ, Jamal MAHM, Hong ST. The function of bacterial HtrA is evolutionally conserved in mammalian HtrA2/Omi[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 5284.
- [12] Liu D, Wu L, Wu Y, *et al.* Heat shock factor 1-mediated transcription activation of Omi/HtrA2 induces myocardial mitochondrial apoptosis in the aging heart[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(20): 8982-8997.
- [13] Liu X, Lei J, Wang K, *et al.* Mitochondrial Omi/HtrA2 promotes caspase activation through cleavage of HAX-1 in aging heart[J]. *Rejuven Res*, 2017, 20(3): 183-192.
- [14] Jost PJ, Vucic D. Regulation of cell death and immunity by XIAP[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2020, 12(8): a036426.
- [15] Tu H, Costa M. XIAP's profile in human cancer[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(11): 1493-1493.
- [16] Winkler J, Rand ML, Schmutz M, *et al.* Omi/HtrA2 and XIAP are components of platelet apoptosis signalling[J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(3): 532-539.
- [17] Wang P, Hu Y, Yao D, *et al.* Omi/HtrA2 regulates a mitochondria-dependent apoptotic pathway in a murine model of septic encephalopathy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(6): 2163-2173.
- [19] Gao Y, Zhang W, Zeng LQ, *et al.* Exercise and dietary intervention ameliorate high-fat diet-induced NAFLD and liver aging by inducing lipophagy[J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101635.
- [20] Liang Y, Zhang Z, Tu J, *et al.*  $\gamma$ -Linolenic acid prevents lipid metabolism disorder in palmitic acid-treated alpha mouse liver-12 cells by balancing autophagy and apoptosis via the LKB1-AMPK-mTOR pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(29): 8257-8267.
- [21] Nasiri-Ansari N, Nikolopoulou C, Papoutsis K, *et al.* Empagliflozin attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in high fat diet fed ApoE(-/-) mice by activating autophagy and reducing ER stress and apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2).
- [22] 桑文华,曾美纯,陈莎,等. 自噬抑制剂氯喹对急性酒精诱导小鼠肝损伤的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2018, 34(2): 102-105.
- [23] Shen B, Feng H, Cheng J, *et al.* Geniposide alleviates non-alcohol fatty liver disease via regulating Nrf2/AMPK/mTOR signalling pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(9): 5097-5108.

(上接第 145 页)